

RAPPORT DE STAGE

Master 1 du parcours Biodiversité Végétale Tropicale

Caractérisation moléculaire des ITS des champignons dégradant les bois de Guyane

par

Malyna SUONG

Responsable de stage : Alba ZAREMSKI

Laboratoire d'accueil : CIRAD-GFP « Génétique Forêts et Palmiers »,
TA A-108/C Campus de Baillarguet,
34398, Montpellier Cedex 5- France

Directeur du laboratoire : Jean-Marc BOUVET

Du 28 février au 29 juillet 2011

PRÉFACE

Le CIRAD, Centre de coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement, est un organisme scientifique spécialisé dans la recherche agronomique au service du développement des pays du Sud et l'outre-mer français. Il intervient dans plus de 40 pays dans le monde.

Le CIRAD possède 56 unités de recherche réparties dans 3 départements :

- Systèmes biologiques
- Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux
- Environnements et sociétés

Mon stage s'est déroulé au sein du département « Systèmes biologiques » au laboratoire de l'équipe de recherche GFP « Génétique des Forêts et Palmiers », dirigée par Monsieur Jean-Marc Bouvet. Cette unité a pour but de concevoir des stratégies de gestion de la diversité intraspécifique dans les domaines de l'amélioration génétique, de l'aménagement des espaces forestiers et agroforestiers, de la conservation des espèces menacées et de la restauration des forêts dégradées.

Les objectifs scientifiques de l'équipe sont d'évaluer la diversité au sein des espèces forestières par une approche moléculaire et phénotypique, en comprendre les déterminants génétiques et environnementaux et quantifier la dynamique dans l'espace et dans le temps.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toute l'équipe pédagogique de l'Université de Montpellier 2, responsable du parcours de Biodiversité Végétale Tropicale.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante, et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant mon stage au sein du CIRAD :

- Monsieur Jean-Marc Bouvet pour m'avoir accueilli dans ses locaux et pour m'avoir rendu ce stage possible.

- Mon maître de stage Alba ZAREMSKI pour son soutien, ses conseils prodigués tout au long de ce stage et qui a contribué à l'élaboration de ce rapport.

- Bénédicte Favreau et Alexandre Vaillant pour m'avoir répondu à mes nombreuses questions, pour leurs conseils et pour l'ensemble des manipulations.

- Létizia CAMUS-KULANDAIVELU pour m'avoir fait partager ses expériences et pour ses explications en phylogénie.

- Les nombreux stagiaires, notamment Julie, Jonathan, Anthéa et Athéna, pour m'avoir encouragé, pour leurs explications, pour leur aide et pour leur gentillesse.

- Je remercie l'ensemble du personnel de l'équipe GFP, pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Enfin, remercie Dr. Georges MICHALOUD pour ses corrections et ses conseils.

TABLE DES MATIERES

Préface

Remerciement

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

I. Introduction	1
1.1. Présentation du projet CIRAD.....	1
1.2. Intérêt et objectif du projet	1
1.3. Objectif du stage	1
1.4. Etat de l'art	2
1.4.1. La flore et les champignons de Guyane	2
1.4.2. Les champignons.....	2
1.4.2.1. Caractères généraux.....	2
1.4.2.2. Les champignons lignivores.....	3
a. La pourriture cubique ou brune	4
b. La pourriture fibreuse ou blanche	4
c. La pourriture molle	4
1.4.3. Les régions moléculaires spécifiques étudiées	5
II. Matériels et méthodes	6
2.1. Matériel biologique.....	6
2.1.1. Echantillons et lieux d'étude.....	6
2.2.2. La récolte des champignons lignivores en Guyane.....	6
2.2.3. La conservation des échantillons au laboratoire	6
2.2. Méthode moléculaire.....	7
2.2.1. Préparation des échantillons pour les études moléculaires.....	7
2.2.2. Extraction de l'ADN fongique.....	7
2.2.3. Quantification de l'ADN total par spectrophotométrie	7
2.2.4. La PCR : Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire	7
2.2.5. Analyse des produits de PCR à partir de gel d'électrophorèse	8

2.2.6. Séquençage	9
2.2.7. Analyse et alignement des séquences	9
2.2.8. Analyse des séquences par comparaison (BLAST) avec les banques de données (GENBANK)	9
2.2.9. Constitution d'un fichier de séquences de référence.....	10
III. Résultats et discussions	11
3.1. Extraction de l'ADN fongique et les résultats de quantification de l'ADN total	11
3.2. La PCR et l'analyse des produits de PCR à partir de gel d'électrophorèse	12
3.3. Le séquençage	12
3.4. Analyse et alignement des séquences.....	13
3.5. Analyse des séquences par comparaison (BLAST)	14
IV. Conclusions et perspectives	16

Références bibliographiques

Les annexes

Résumé et abstract

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Carpophore sec de l'espèce.....	1
Figure 2.	Echantillons de souches pures.....	1
Figure 3.	Le champignon de pourriture cubique <i>Serpula lacrymans</i> attaquant un bois indéterminé	4
Figure 4.	Le champignon de pourriture fibreuse, <i>Coriolus versicolor</i> attaquant le bois dans le sens des fibres	4
Figure 5.	La pourriture molle.....	4
Figure 6.	L'opéron du gène d'ARNr ribosomiques des eucaryotes	5
Figure 7.	Plan des sites forestiers étudiés en Guyane française.....	6
Figure 8.	Fructifications sur un arbre sur pied	6
Figure 9.	Photo de spectrophotomètre SHIMATSU	7
Figure 10.	Paramètre du cycle de la PCR.....	8
Figure 11.	Profil des marqueurs de poids moléculaires utilisés	9
Figure 12.	Gel de contrôle (agarose 0.8%) ne présentant pas d'amplifiât après PCR (Go Taq).....	12
Figure 13.	Gel de contrôle présentant d'amplifiâts après la PCR (Tap Phusion)	12
Figure 14.	Résultat d'une séquence d'électrophorégramme interprétable	13
Figure 15.	Séquence d'électrophorégramme présentant la contamination	13

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Résultats de concentration des ADN totaux de 80 carpophores secs et de 27 souches pures étudiés	11
------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxiribo Nucléique
ARN:	Acide Ribo Nucléique
BET :	Bromure d'éthidium
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
dATP:	Désoxy adénine tri-phosphate
dCTP:	Désoxy cytosine tri-phosphate
dGTP:	Désoxy guanine tri-phosphate
dTTP:	Désoxy thymine tri-phosphate
dNTPs :	Désoxy nucléotide tri-phosphate
E1:	Elution Buffer
EDTA:	Ethylene-diamine tetra-acetic acid
ITS:	Internal Transcribed Spacer
N2:	Precipitation Buffer
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
Npb.	Nombre de paires de base
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Pb :	Paires de base
R2:	Resuspension Buffer (Tampon de resuspension)
TAE :	Tris Acetate EDTA
Tm:	Melting Temperature (Température de fusion)
W4:	Wash Buffer
W5:	Wash Buffer



(Source personnelle)

Figure 1. Carpophore sec de l'espèce *Polyporus guianensis* de la collection du CIRAD



(Source personnelle)

Figure 2. Souches pures de champignons lignivores de la collection du CIRAD

I. INTRODUCTION

1.1. Présentation du projet CIRAD

Le CIRAD possède une collection de 80 carpophores secs (Figure 1) et de 27 cultures de mycéliums purs de champignons (Figure 2) parasites des bois de Guyane française, dont la plupart sont des Basidiomycètes. Cette collection est essentiellement le fruit de récoltes et d'isollements réalisés généralement à l'occasion de déplacements effectués entre 1952 et 2010 dans les sites forestiers de Guyane. Toutes les identifications ont été réalisées sur des fructifications et basées sur les méthodes traditionnelles d'observation par des mycologues reconnus au niveau national et international, parmi lesquels Monsieur J.Boidin, Madame A.David de la Faculté de Pharmacie de Lyon, Monsieur Courtecuisse et Monsieur Duhem du Museum National d'Histoire Naturelle.

Mon stage s'effectue dans le cadre du projet ANR « E-TRICEL : Exploration de la biodiversité enzymatique pour la complémentation du sécrétome de *Trichoderma reesei* afin d'améliorer l'hydrolyse des lignocelluloses ». Ce projet a pour but d'améliorer l'hydrolyse des lignocelluloses par modelage du génome de *T. reesei* avec les nouvelles protéines identifiées. La biodiversité naturelle sera examinée au sein de la flore fongique présente en forêt tropicale. En effet, les champignons de ce biotope très particulier se développent et hyperproduisent des enzymes aux propriétés catalytiques uniques pour la biodégradation des lignocelluloses. Ce projet a débuté en 2009 et se terminera en 2012.

1.2. Intérêt du projet

Ce projet s'inscrit donc dans la mise en place d'un partenariat durable avec la Guyane. Ce département fait de la France un des états les plus riches en biodiversité naturelle grâce à ses forêts tropicales et, à l'heure actuelle, seulement 3% de ses 25 000 espèces fongiques potentiellement présentes sont décrites (Joseph P. et Lise C., 2009). De plus, l'intérêt de ce travail sera porté sur les séquences des taxons des champignons tropicaux, en particulier ceux qui dégradent le bois qui sont actuellement sous-représentés dans la classification.

1.3. Objectif du stage

L'étude entreprise dans le cadre de mon travail aura pour objectifs principaux de comprendre la diversité des champignons de Guyane où la microflore est peu ou pas connue (Anderson I.C. et Cairney J.W. G. 2004), et de la caractériser d'un point de vue taxonomique en utilisant les outils moléculaires. En plus des objectifs précédemment énumérés, cette approche taxonomique devrait aboutir à une meilleure connaissance de la diversité fongique, en particulier celle des champignons qui dégradent les bois.

1.4. L'état de l'art

1.4.1. La flore et les champignons de Guyane

La Guyane est une région et un département d'outre-mer de la France. Elle constitue le plus grand massif forestier et la plus grande forêt tropicale au sein de l'Union Européenne (Latreille et *al.* 2004). La forêt couvre 80% du territoire guyanais. La forêt guyanaise se caractérise par une très grande diversité en espèces d'arbres puisque l'on en compte à ce jour plus de 1 200 espèces, contre moins de 200 recensées en métropole. Parmi ces espèces, certaines sont remarquables de par leur grande résistance face aux rigueurs du climat (taux d'humidité élevé) et aux processus de décomposition. Ces processus induisent la production de systèmes enzymatiques spécifiques et uniques chez les champignons lignocellulolytiques.

A l'heure actuelle, la diversité des champignons lignocellulolytiques tropicaux est encore très mal connue ainsi que la gamme des enzymes capables de dégrader les lignocelluloses présentes dans des espèces d'arbres ayant un bois très résistant. Selon le rapport de diversité des écosystèmes forestiers des Caraïbes (d'au moins 5 pour 1 selon Joseph P. et Lise C., 2009) et le nombre de plantes recensées en Guyane de l'ordre de 5 000 la biodiversité fongique est estimée à 25 000 espèces dont seules 3 % sont décrites. Dans ce travail les champignons en particulier ceux qui dégradent le bois sont étudiés. Selon leur phénotype, ceux-ci peuvent être classés en : « pourritures blanches ou fibreuses » (essentiellement des basidiomycètes dont l'activité ligninolytique est prépondérante), « pourritures brunes ou cubiques » (essentiellement des basidiomycètes à la fois ligninolytiques et hémicellulolytiques), et en « pourritures molles » (deutéromycètes hémicellulolytiques en particulier *Trichoderma* et *Aspergillus*).

1.4.2. Les champignons

1.4.2.1. Caractères généraux

Longtemps considérés comme des végétaux, les champignons forment, aujourd'hui, un règne à part entière : le règne des *Fungi* (du latin *fungus*, le champignon), qui compte environ un million d'espèces. Ce sont des organismes eucaryotes, c'est-à-dire possédant un véritable noyau, qui se différencient principalement des végétaux par leur absence de pigments chlorophylliens ce qui les rend incapables de synthétiser la matière carbonée indispensable à leur nutrition. Ils doivent donc vivre aux dépens des produits carbonés élaborés par d'autres organismes, autotrophes, vivants ou morts. Ainsi, ils se nourrissent soit en décomposant de la

matière organique morte, ils sont alors qualifiés de saprophytes, soit au détriment d'autres organismes, ils sont alors parasites, ou bien encore en vivant en symbiose avec des organismes chlorophylliens.

Le bois, étant naturel et de composition organique, est susceptible d'être altéré par ces champignons qui se développent en présence d'une humidité supérieure à 20% (Fougerousse, 1976). En effet, il contient les substances carbonées qui leurs sont nécessaires. Les champignons se développant en surface ou à l'intérieur du bois sont appelés lignicoles mais cette dénomination générale ne prend pas en compte l'action du champignon sur le bois. On distingue alors deux classes :

- **Les champignons lignicoles vrais** qui se développent sur le bois en lui tirant des substances nutritives ou de réserve, comme l'amidon, mais sans dégradation de ses constituants. Cela ne provoque ainsi seulement qu'un désordre esthétique.
- **Les champignons lignivores** qui, en plus de se développer sur le bois, le dégradent puisqu'ils entraînent une destruction des composants majoritaires du bois, à savoir la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Cela provoque ainsi une pourriture conduisant à une perte de la résistance mécanique.

1.4.2.2. Les Champignons lignivores

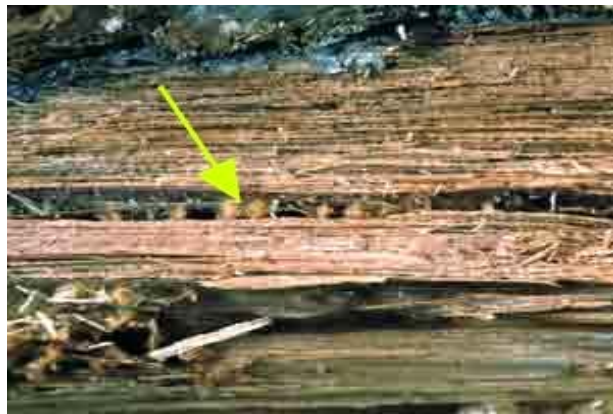
Parmi les champignons, ceux qui s'attaquent au bois le font en dégradant soit la lignine soit la cellulose ou les deux à la fois (Fougerousse M., 1976) et sont nommés lignivores du latin « *lignum* », bois. Ils appartiennent majoritairement aux classes des Basidiomycètes, des Ascomycètes et des Deutéromycètes. Pour se développer, un des facteurs les plus importants est l'humidité : en effet, tant que le bois conserve une humidité inférieure ou égale à 20%, il demeure insensible à l'attaque des champignons. L'humidité optimale pour le développement du mycélium se situe entre 30% et 50% selon les espèces.

Quand ils se développent et puisent dans le bois les éléments nécessaires à leur survie, ces champignons engendrent la pourriture du bois, c'est-à-dire, une détérioration profonde et irréversible de ses propriétés par hydrolyse enzymatique. Ils attendent l'intégrité du bois en agissant au niveau structurel : le champignon met à profit les éléments constitutifs de la paroi en sécrétant des enzymes qui dégradent la cellulose et la lignine. Cela entraîne un affaiblissement, voire la destruction complète des propriétés mécaniques, physiques, chimiques et esthétiques du bois.



(Source du Cirad)

Figure 3. Le champignon de pourriture cubique *Serpula lacrymans* attaquant un bois indéterminé



(Source du Cirad)

Figure 4. Le champignon de pourriture fibreuse *Coriolus versicolor* attaquant le bois dans le sens des fibres du bois.

La flèche jaune montre le champignon.



(Source: <http://www.c2m-expertise-diagnostics-immobiliers.fr/>)

Figure 5. Pourriture molle

Cependant, les champignons lignivores diffèrent selon leur mode d'action. Ainsi, on distingue différents types de dégradations entraînant trois types de pourritures possibles : la pourriture cubique (classe des Basidiomycètes), la pourriture fibreuse (classe des Basidiomycètes) et la pourriture molle (classe des Ascomycètes et des Deutéromycètes).

a. La pourriture cubique ou brune

Ils dégradent de façon préférentielle la cellulose, la lignine reste très peu touchée. Ce phénomène n'est pas discernable extérieurement pendant les premiers stades de l'attaque, il se traduira peu à peu par une coloration foncée du bois (d'où son nom de pourriture brune) et l'apparition de fentes longitudinales puis transversales délimitant des structures plus ou moins cubiques. Le bois est très altéré dans sa structure et devient friable. La phase ultime de la dégradation conduit à une perte totale des résistances mécaniques (Figure 3).

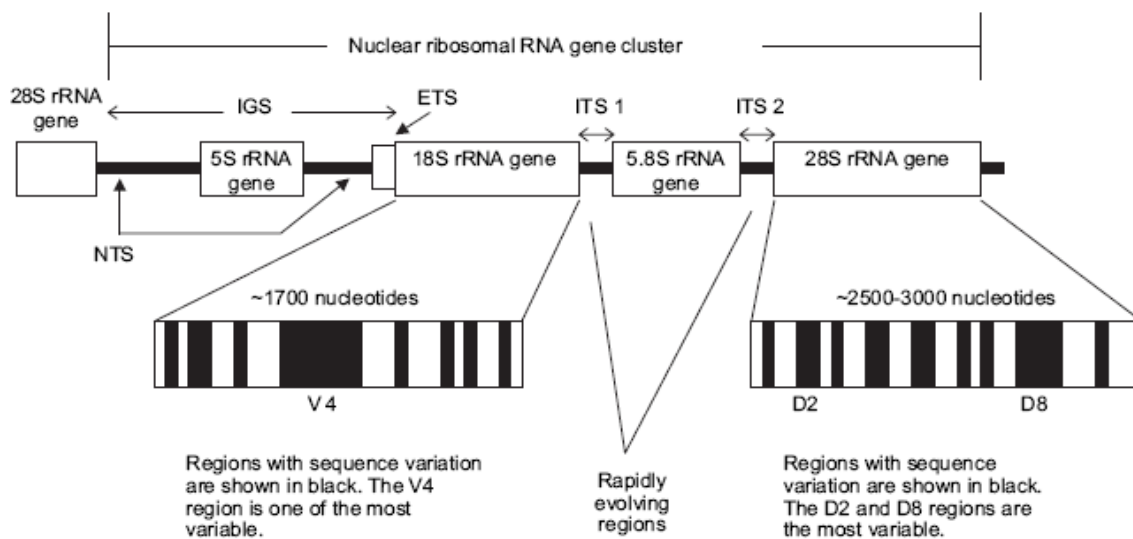
On trouve notamment *Serpula lacrymans* (le mérélu), *Coniophora puteana* (le conioaphore), *Poria vaillantii*, *Gloeophyllum trabeum*...

b. La pourriture fibreuse ou blanche

Tous les constituants des membranes sont touchés mais la lignine est dégradée préférentiellement. On peut distinguer deux groupes de pourriture fibreuse, les premières qui sont capables de dégrader simultanément les polymères structuraux c'est-à-dire, lignine, hémicelluloses et cellulose dans une proportion similaire (simultaneous white rot) tandis que les secondes ont une préférence pour dégrader la lignine et les hémicelluloses avant d'attaquer la cellulose (preferential white rot) (Eaton et Hale, 1993). Les champignons fibreux sont les seuls capables de dégrader totalement la lignine. Le bois attaqué conserve en partie sa structure et son aspect n'est modifié que par un changement de couleur, il prend une consistance molle et n'est pas friable. Ce type de pourriture n'est pas discernable macroscopiquement, pendant les premiers stades, mais peu à peu le bois subit une décoloration progressive conduisant à une couleur blanchâtre et se décompose en fibrilles (Figure 4). Le champignon fibreux le plus étudié est *Coriolus versicolor* mais on peut citer également *Pycnoporus sanguineus* et *Pleurotus Ostreatus*.

c. La pourriture molle

Ce type de pourriture est plus rare car ces champignons exigent une humidité élevée pour se développer. Ils sont capables de dégrader la cellulose, les hémicelluloses et parfois la lignine mais de façon partielle. La pourriture molle est caractérisée par un ramollissement superficiel du bois qui devient alors noirâtre, modifiant ainsi ses propriétés physiques et mécaniques. La photo de pourriture molle est présentée dans la Figure 5.



(Source du Cirad)

Figure 6. L'opéron du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes

L'opéron comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S et 25S ou 28S), et des régions « entre-espaces » entremêlées (IGS : intergenic spacer ; NTS : non-transcribed spacer ; ETS : externally transcribed spacer ; ITS : internally transcribed spacer) (D'après (Mitchell et Zuccaro, 2006).

1.4.3. Les régions moléculaires spécifiques étudiées

Méthodes de caractérisation taxonomique applicables aux champignons : *L'ADN ribosomal nucléaire*; *Choix des amorces* ; *Amplification par PCR* ; *Séquençage* ; *BLAST*.

Encore aujourd'hui, le choix des amorces et du gène cible à amplifier pour identifier les champignons d'un échantillon environnemental est discuté (Anderson et Cairney, 2004). Les auteurs, White et *al.* (1990) ont défini les premières amorces de PCR pour l'amplification des gènes codant pour l'ADNr 18S et pour les ITS fongiques (Figure 6).

Dans notre étude taxonomique des espèces étudiées, nous avons choisi les amorces ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') car ces amorces sont couramment utilisées pour établir l'identification de souches et les arbres phylogénétiques (Anderson et Cairney, 2004). Ces amorces ont été dessinées pour amplifier la région comprenant les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 relativement variables et la petite sous unité ribosomale 5,8 S peu variable (Gardes et Bruns, 1993 ; Schmidt et Moreth, 2000 ; Martin et *al.*, 2002 ; Guerin-Laguet et *al.*, 2003 ; Mitchell et Zuccaro, 2006). Les outils moléculaires comme la PCR et le séquençage ont été utilisés. L'identification est réalisée en comparant la séquence des champignons à identifier aux séquences de la banque GENBANK (www.ncbi.org). Cette réalisation est un élément essentiel de la caractérisation taxonomique (Zaremski, 2005).

Dans ce document, après un état de l'art visant à une meilleure connaissance du bois en tant que substrat et des champignons qui le dégradent, deux études seront développées: tout d'abord, une étude destinée à préciser et fiabiliser la caractérisation moléculaire de 80 carpophores secs ou anciens de champignons. Cette caractérisation sera réalisée indépendamment du recours aux caractères morphologiques macro et microscopiques des fructifications nécessaires à l'identification des genres et espèces et permettra d'établir la cohérence entre la classification classique et la classification moléculaire. Puis, une deuxième étude sera réalisée sur 27 mycéliums purs obtenus selon les méthodes classiques de mise en culture et d'isolement sur boîtes gélosés.

En conclusion, nous insisterons particulièrement sur les perspectives fondamentales et appliquées offertes par tous ces outils de caractérisation moléculaire dont pourraient bénéficier l'ensemble des industries du bois et des bio-carburants.



(Source du Cirad)

Figure 7. Le réseau des placettes permanentes des sites forestiers en Guyane



(Source du Cirad)

Figure 8. Fructification fongiques sur un arbre sur pied

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels biologiques

2.1.1. Echantillon et lieu étudié

Notre travail de stage a été réalisé donc à partir de ces 80 carpophores secs et 27 mycéliums de souche purs de la Guyane française, qui ont été récoltés entre les années 1952 et 2010, en particulier dans le réseau des sites forestiers de Guyane (Figure 7) et également sur les bois de construction de Guyane (bois de : charpente, traverses, poteaux, jetée,...).

Ce réseau comprend 9 sites forestiers. Par ailleurs, la collection des fructifications fongiques dans notre travail avaient été faite dans plusieurs sites parmi ces 9 sites par rapport au déplacement et à la disposition des mycologues. Selon la liste des notes, on a pu constater quand même que la plupart de nos échantillons ont été récoltée en Paracou.

2.1.2. La récolte des champignons lignivores en Guyane

Ces champignons lignivores ont été choisis frais et en bon état sur le bois mort, sur les arbres sur pied (Figure 8). Ils ont été prélevés à l'extrême base du stipe afin d'éviter de détruire les éléments fragiles. Chaque échantillon a été enveloppé dans du papier aluminium avec l'étiquette correspondante et cela avant de le mettre dans une boîte ou dans une caisse. Chaque échantillon est ainsi classé par ordre numérique de récolte.

Au moins deux exemplaires de chaque champignon a été récolté: certains seront utilisés pour décrire les caractères macroscopiques et d'autres pour réaliser une sporée, d'autres pour l'examen microscopique. Parallèlement, chaque fructification sera photographiée (vue d'ensemble) sur place, en forêt ou après récolte au laboratoire. Ces photos servent à constituer une fiche technique pour chaque champignon.

2.1.3. La conservation des échantillons au laboratoire

On peut conserver un exemplaire dans la salle froide de 4 °C pendant une semaine ou au congélateur à -80°C pour une durée indéterminée. Les carpophores secs ont été conservés dans des boîtes plastiques scellées avec une fiche sur laquelle sont notées le numéro d'ordre de la récolte, la date, le lieu et le nom de l'essence si possible. Et les souches pures ont été conservées dans des boîtes de pétries congelées et bien fermés sur lesquelles sont notées également le numéro, la date, le lieu et le nom de l'essence. Les boîtes ont été conservées dans la salle froide de -4 °C pour une durée indéterminée.

La liste des 80 carpophores secs et des 27 souches pures de champignons de Guyane étudiés lors de mon stage est présentée en Annexe 2 a et 2 b.



(Source personnelle)

Figure 9. Spectrophotomètre SHIMATZU

2.2. Méthodes moléculaires

2.2.1. Préparation des échantillons pour les études moléculaires

Les 80 échantillons de carpophores secs ont été réduits en poudre, de façon stérile, puis broyés dans l'azote liquide. Les 27 échantillons de souches pures (mycélium pur) ont été broyés également avec l'azote liquide. Nous avons placé ensuite 100 mg de poudre fine obtenue de chaque échantillon de carpophore ou de mycélium pur dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL. Ils ont été stockés au congélateur à -80°C pour les étapes ultérieures.

2.2.2. Extraction de l'ADN fongique

La méthode d'extraction de l'ADN par le protocole de Kit Invitrogen⁽¹⁾ « **Pure Link Plant Total DNA Purification Kit** » (<http://www.invitrogen.com/>) pour les plantes a été choisi pour cette étude. Ce protocole permet d'obtenir un culot clair et sans pigments. Le kit Invitrogen contient : du tampon de resuspension R2 (EDTA, sodium chlorite et TRIS), du SDS à 20%, de l'ARNase (20mg/ml), du tampon de précipitation N2, du tampon de liaison B4 (Guanidine, HCL 7,5ml, 11,25ml d'éthanol), du tampon de lavage W4 qui contient du thiocyanate, du tampon de lavage W5 (10 ml de W4 avec 40ml d'éthanol ajouté) et du tampon d'élution E1. Cette étape dure environ 2h (le protocole d'extraction est présenté en Annexe 1). Tous les ADN totaux après cette extraction ont été stockés au congélateur à -20°C.

2.2.3. La quantification de l'ADN total

Après l'extraction de l'ADN total, l'ADN est quantifié par un spectrophotomètre SHIMATZU (Figure 9). Il donne directement la valeur de la concentration en ADN de l'échantillon pour une lecture immédiate du résultat. Il mesure la concentration et la pureté de l'ADN extrait avec 3µl d'échantillon en indiquant un ratio d'absorbance à 260nm et 280nm. Ce ratio 260/280 doit se rapprocher de 1,8 pour qualifier les échantillons de pur. Des valeurs inférieures à 1.8 indiqueraient la présence d'impuretés ou de protéines absorbantes aux environ des mêmes longueurs d'ondes.

¹ Invitrogen est une société spécialisée en produit pour la biologie moléculaire. Elle a été créée en 1987 et se situe actuellement à Carlsbad au Nouveau-Mexique (Etats-Unis). (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Invitrogen>)

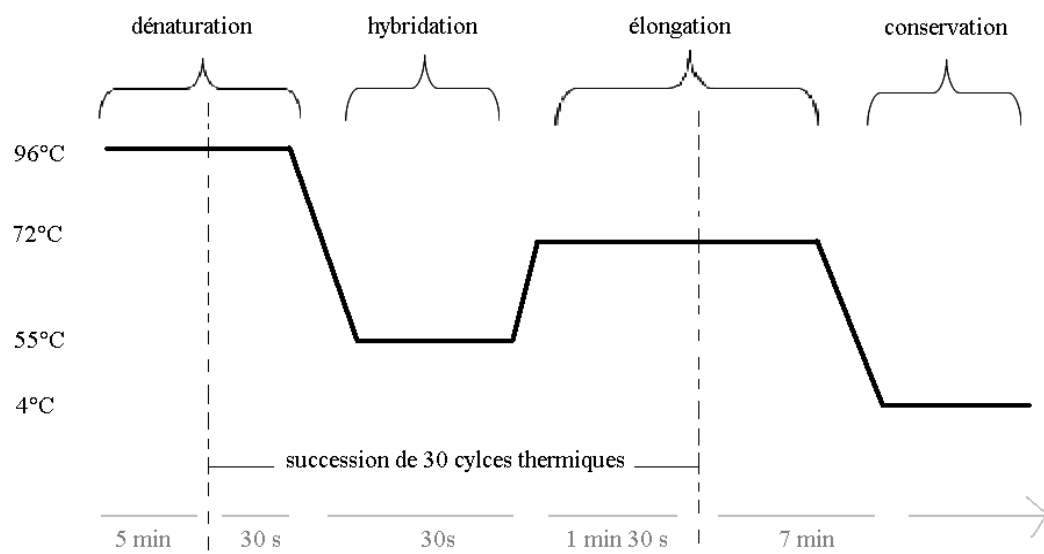


Figure 10. Paramètre du cycle de la PCR, on réalise 30 cycles.

2.2.4. La Polymérase Chain Reaction (PCR): amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire

C'est une réaction enzymatique qui permet l'amplification en chaîne d'une région spécifique de l'ADN. La PCR permet la réplication *in vitro* d'un fragment spécifique de l'ADN avec l'obtention en grande quantité un fragment spécifique d'ADN à partir d'une quantité initiale en ADN très faible (Mullis et Faloona, 1987). Cette méthode a été décrite initialement par Kary Mullis en 1985.

Les PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 50 µL contenant 5 µL de matrice ADN, 10 µL de tampon de réaction 5 X (7,5mM de MgCl₂, FINNZYMES), 2 µL de solution de chaque amorce : ITS4-myc et ITS1-myc (Ecerofins MWG Operon), 4 µl de solution de dNTPs (10µl de produit mère de chaque dNTP: dATP, dCTP, dGTP et dTTP 100mM dans 360µl d'eau millipore), 0,30µL de Taq polymérase thermostable, et de l'eau millipore 26,70µl pour compléter jusqu'à 50 µL. Des témoins sans ADN sont réalisés pour tester la présence d'éventuelles contaminations dans les réactifs et les tampons. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Eppendorf (Eppendorf Mastercycler). Tous les travaux de PCR ont été faits à l'aide du matériel réservé uniquement à la PCR.

Il est à noter que nous avons utilisé 2 types de Taq différents, Go Taq et Taq Phusion(2U/µl à volume 50µl, FINNZYMES), pour évaluer leur efficacité respective.

Application des ITS

Les régions ITS de l'ADNr nucléaire ont été amplifiées par PCR à l'aide d'une paire d'amorce spécifique des champignons ITS1/ITS4 (White et al., 1990 ; Gardes et Bruns, 1993) : ITS 1-myc, ^{5'} TCCGTAGGTGAACCTGCGC ^{3'}; ITS 4-myc : ^{5'}TCCTCCGCTTATTGATATGC ^{3'}. Les paramètres du cycle de la PCR comptent 30 cycles et sont présentés dans la figure 10.

2.2.5. Analyse des produits de PCR et purification des fragments d'ADN sur gel

Cette étape a pour but de séparer les différents fragments d'acides nucléiques par rapport à leur taille. Nous avons quantifié la concentration en produit PCR en déposant 5 µL d'amplifiats mélangés avec 2 µL de bleu de charges « 6xDNA loading » (6 ml de glycérol 60 % qui alourdit l'ADN, 120 µl d'EDTA 60mM à pH 8, 4 mg du bleu de Bromophénol 0,2 %, 4 mg du Xylène Cyanol 0.2% et 3.880 µl d'eau millipore) dans les puits d'un gel d'agarose à

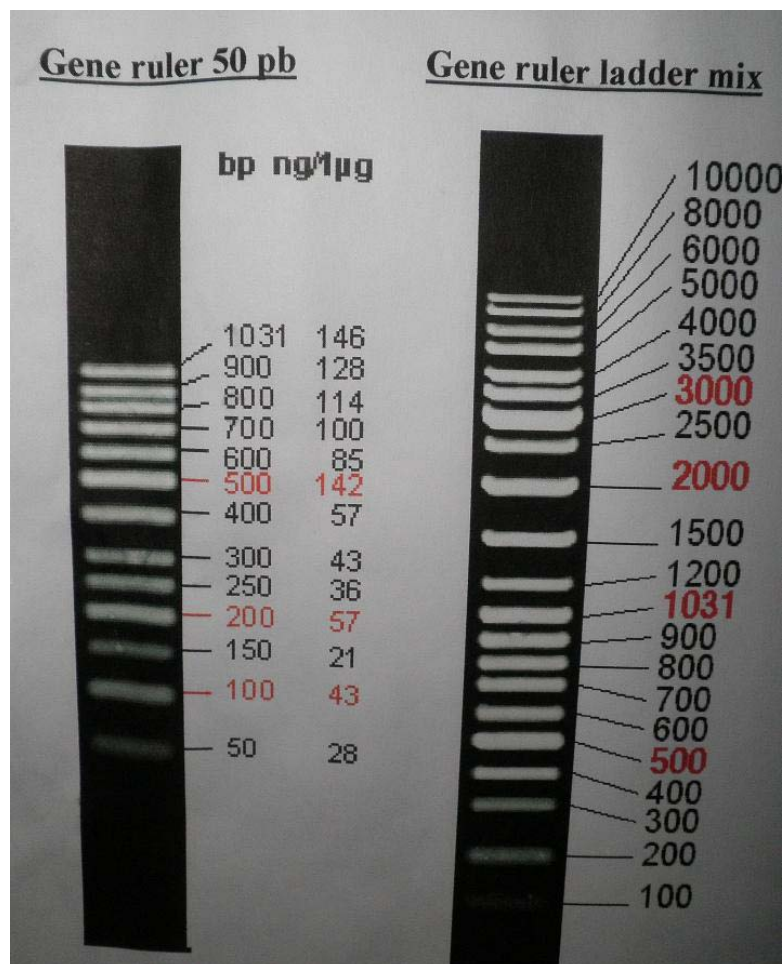


Figure 11. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés dans l'étude : Gene Ruler 50bp et Gene Ruler DNA Ladder Mix de Fermentas

1,5 % (30ml de TAE 0.5X ⁽²⁾ avec 0,45g de gel d'agarose). Nous avons fait au total 12 gels dont 5 avec la Go Taq lors du travail effectué à la PCR et 7 avec la Taq Phusion lors de la réalisation de la manipulation de PCR. La migration s'est effectuée sous une tension de 75 Volts pendant 1heure dans un tampon d'électrophorèse TAE 0.5X (le tampon TAE 0.5X : Tris Acétate EDTA n'est pas utilisé seulement pour le tampon de la cuve mais aussi pour le gel. Le Tris impose un pH à 8 donc l'ADN est chargé négativement. L'EDTA chélate les cations (cofacteurs des nucléases) qui sont susceptible d'entraîner des ruptures des liaisons phosphodiesters.). Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont : 50bp (Gene Ruler 50bp ADN Ladder 0,5µg/µl à 50µg), et Gene Ruler DNA Ladder Mix (0,5mgDNA/ml à 0,05mg) de Fermentas. Le profil des marqueurs de poids moléculaire est présenté dans la Figure 11. Les bandes d'acides nucléiques ont été visualisées sous UV à l'aide de la solution de bromure d'éthidium (BET) ⁽³⁾. Le BET (10mg/ml) comporte un groupement qui s'intercale entre les plans de bases successives des chaînes polynucléotidiques. La fluorescence à 590 nm est plus intense pour le groupement intercalé par rapport au groupement libre. Enfin, tous les gels ont été photographiés.

2.2.6. Le séquençage

Nous n'avons choisi que les échantillons pour lesquels nous avons obtenu un résultat positif par PCR. Les produits de PCR de ces échantillons sont ajustés à un volume de 15 µl pour chaque ITS 1 et ITS 4. Ils ont été envoyés à MACROGEN en Corée du sud pour être séquencer (<http://www.macrogen.com/>).

2.2.7. Analyse et alignement des séquences

Les séquences simples brins obtenues lors du séquençage avec les amorces ITS1 et ITS4 ont été corrigées à partir de l'interprétation des électrophorégrammes avec le logiciel CHROMAS. La recherche de similarité dans les régions ITS1 et ITS2 du génome a été réalisée en utilisant le logiciel BLASTn dans la banque de gènes NCBI. Nous utilisons le logiciel d'alignement CHROMAS, afin de nettoyer les séquences avant de les soumettre à nouveau à Blast. Il convient de noter que ce travail de correction avec le logiciel CHROMAS demande beaucoup de rigueur et de temps. Il m'a fallu 30 jours pour l'effectuer.

Ensuite, dans un travail ultérieur, elles seront assemblées avec le logiciel CHROMAS PRO (front et reverse).

² Le TAE 0.5X est préparé de TAE 50X 20 mL (2%) avec de l'eau désionisée 980 ml (98% de volume total).

³ La solution BET : 150µl de BET (10Mg/ml) avec 2,5L de l'eau stérile.

2.2.8. Analyse des séquences par comparaison avec les banques de données – BLAST

Après avoir reçu nos séquences de Magrogen, nous n'avons sélectionné que des séquences interprétables (sans contamination) pour effectuer la comparaison avec celles des banques de données. L'identité d'une séquence fongique est obtenue après une recherche d'homologie dans les banques de données, comme « Genbank » du Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Nos séquences sont alignées avec celles qui sont connues et présentes dans les banques de données GNEBANK. Les recherches effectuées par BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool) au NCBI fournissent la liste des résultats probables correspondant à notre séquence, avec les valeurs de similarités des séquences.

Les programmes de comparaison de séquences ont pour but de repérer les endroits où se trouvent des régions identiques ou très proches entre deux séquences et d'en déduire celles qui sont significatives et qui correspondent à un sens biologique de celles qui sont observées dans les banques internationales. BLAST détecte de courts segments (onze nucléotides identiques ou deux tripeptides similaires) qui sont localement homologues à la séquence inconnue (Altschul *et al.* 1997).

Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

2.2.9. Constitution d'un fichier de séquences de référence

Lors de la réalisation des BLAST, toutes les séquences de référence proches de nos souches ont été extraites des banques de données NCBI. En fonction des critères de qualité de l'alignement (E-value, maximum d'identité, couverture, etc.), le choix de la séquence la plus pertinente est réalisé entre 3 et 5 premiers résultats qui ont les mêmes régions étudiées comme notre échantillons issus du BLAST, permettant d'identifier les séquences et donc le genre et l'espèce de la souche pure.

Ces séquences de références constitueront ainsi une source de séquences de référence, outil essentiel pour nos études taxonomiques et pour des prochaines études phylogénétiques.

Tableau 1. Les résultats de concentration de l'ADN total par le spectrophotomètre.

Catégories	Nombre des échantillons total	Valeur de concentration maximale (ng/ml)	Valeur de concentration minimale (ng/ml)	Moyenne (ng/ml)	Ecart type	Nombre et % des échantillons indéterminé
Carpophores secs	80	47100	354	14928,71	13469,26	8 (10%)
Souches pures	27	20090	3479	11986,57	5941,86	1 (3.7%)

III. RESULTATS ET DISCUSSION

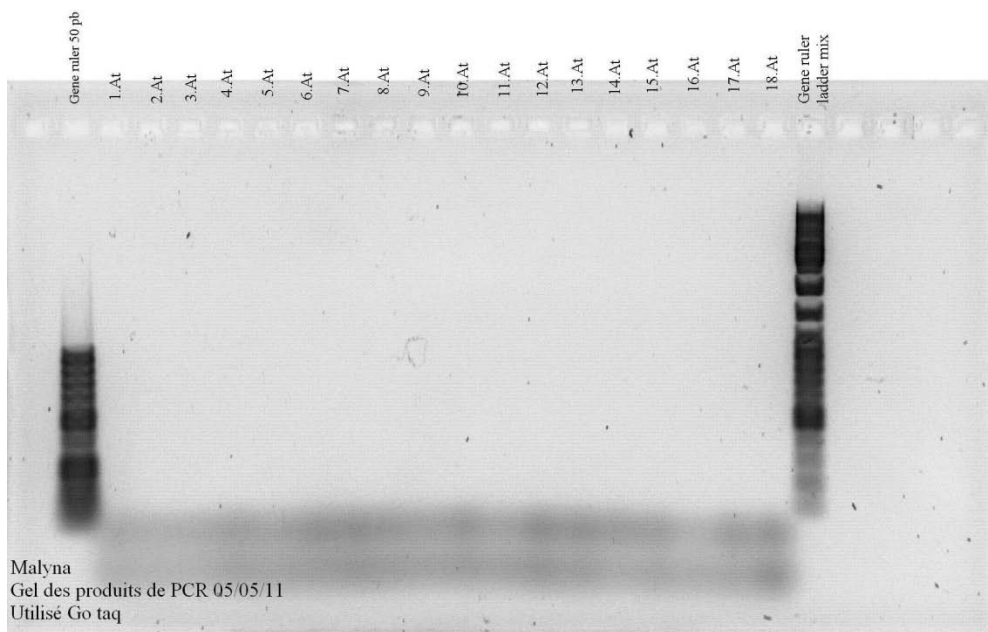
3.1. Extraction de l'ADN et les résultats de quantification de l'ADN total

L'ADN de 107 échantillons de champignons étudiés a pu être extrait et amplifié à l'aide de la spectrophotométrie. La quantification des ADN totaux de nos échantillons a été réalisée. Nous n'avons pas de résultats très favorables avec nos 80 échantillons de carpophores secs. Nous remarquons que 19 échantillons présentent un ratio faible, inférieur à 1.8 (la valeur de 260nm/280nm) et 9 parmi nos 107 échantillons n'ont pas pu être déterminés par la spectrophotométrie. La valeur maximale, la valeur minimale ainsi que la moyenne et l'écart type de la quantification de nos 80 carpophores secs et 27 mycéliums purs de Guyane sont présentés dans le Tableau 1.

D'après le résultat de la quantification, nous avons réétudié nos carpophores secs. Il est à noter que ces champignons (récoltés depuis les années 1952) ont un ADN trop ancien. Environ 10 % de ces carpophores secs n'était pas en très bon état et n'a pas donné la quantité de poudre suffisante (100mg) pour notre étude de l'extraction de l'ADN total. Cela nous conduit à envisager l'amélioration de la méthode de conservation des carpophores secs de champignons pour bien conserver leur ADN. D'un autre point de vue, une étape supplémentaire concernant le lavage du culot lors de l'extraction de l'ADN, peut être envisageable.

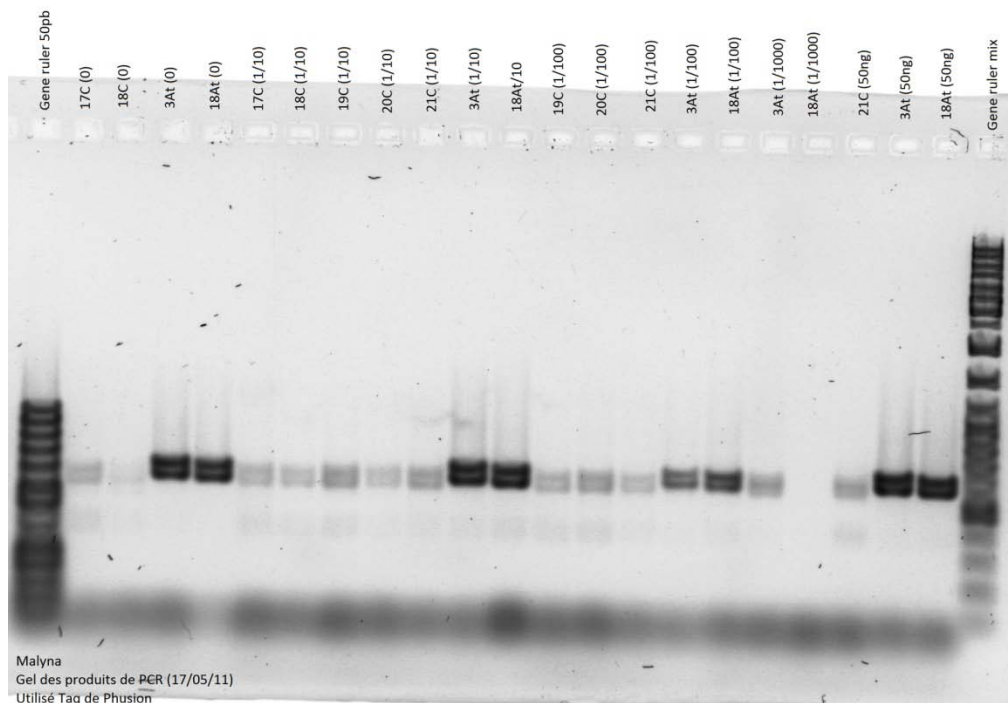
Ces résultats peuvent s'expliquer aussi par l'obtention d'impuretés qui biaiserait les mesures effectuées au spectrophotomètre. En plus, l'observation seulement du ratio 260nm/280nm (la contamination de protéine) lors du passage des échantillons en spectrophotomètre ne nous permettrait pas toujours d'évaluer la pureté de nos échantillons. Il nous a donc fallu être attentif l'ensemble des mesures à 260nm, 280nm, 230nm, 260nm/280nm, 260nm/230nm, la concentration ainsi que la courbe tracée par l'appareil de spectrophotométrie.

Ces résultats de quantification ont montré que les échantillons de champignons qui ont un ADN trop ancien, comme c'est le cas de nos 80 carpophores secs de Guyane, ne nous permettaient pas toujours d'effectuer une extraction optimale et ne nous donnaient pas toujours la concentration suffisante pour nos études moléculaires.



(Source personnelle)

Figure 12. Gel de contrôle (agarose 0.8%) ne présentant pas d'amplifiât après PCR (Go Taq)
Sur le gel nous avons marqué le numéro de CIRAD de chaque échantillon



(Source personnelle)

Figure 13. Gel de contrôle (agarose 0.8%) présentant des amplifiâts après PCR (Taq Phusion)
Les numéros qui sont écrits entre parenthèses indiquent la dilution de nos produits de PCR : (0) sans dilution,
(1/100) dilué au centième.

Néanmoins, nous pouvons affirmer que le protocole mis en place au laboratoire est bien adapté puisque nous avons obtenu de meilleurs résultats pour les échantillons des 27 souches pures. De manière générale, les concentrations observées sont beaucoup plus stables autour de la moyenne pour les souches pures.

3.2. La PCR et l'analyse des produits de PCR à partir de gel d'électrophorèse

Les résultats de gel d'électrophorèse sont le reflet de la bonne amplification de nos ADN totaux par la PCR. En voulant tester la différence d'efficacité entre les deux enzymes polymérases, Go Taq et Taq Phusion, nous avons constaté que pour un même produit d'extraction, l'amplification était effective dans les conditions impliquant la Taq Phusion et non dans celles impliquant la Go Taq. En effet, parmi nos 12 gels d'agaroses d'électrophorèses de produits de PCR, seulement 5 gels avec Go Taq n'ont pas montré du tout la présence d'amplifiât, ce qui indique sans doute l'absence de l'amplification de nos échantillons par la PCR (Figure 12). Nous avons eu 7 gels avec l'enzyme Taq Phusion qui ont eu des amplifiât, ce qui indique l'efficacité de la PCR. La photo de Gel d'agarose présentant des amplifiât après la PCR est présentée dans la Figure 13.

Ces résultats ont indiqué que la Taq Phusion serait plus efficace que la Go Taq pour effectuer le travail de PCR à partir de quantité d'ADN total très faible.

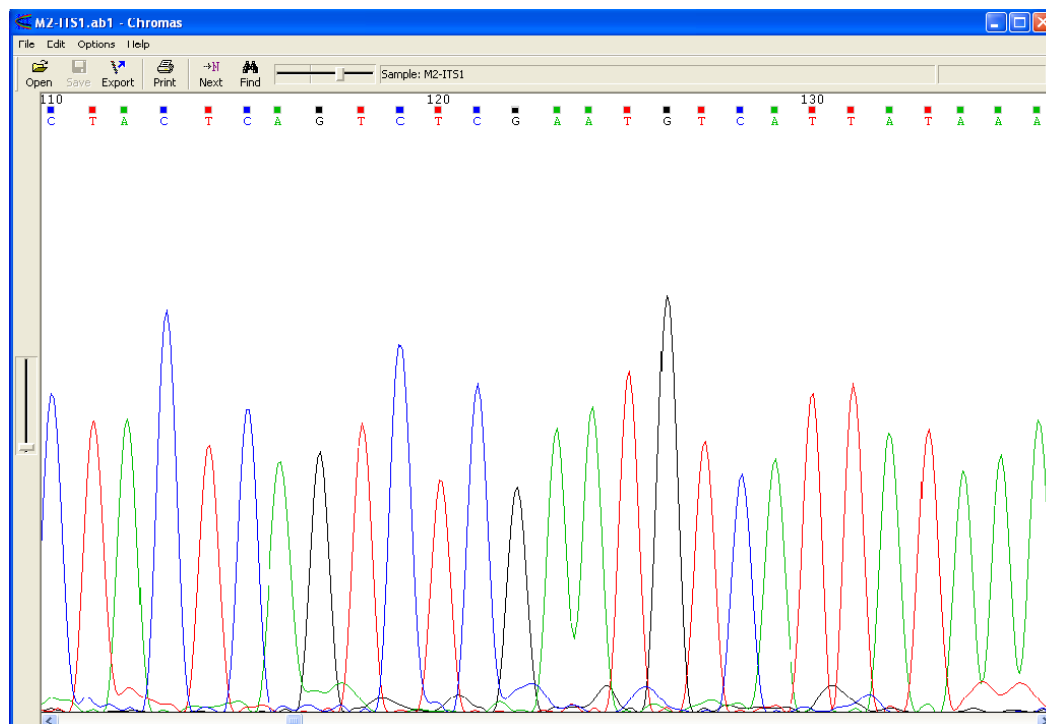
Après les résultats de PCR, le protocole d'amplification est bien adapté à l'ITS pour 95% des champignons pour lesquels nous avons obtenu une bande d'un poids moléculaire d'environ 700 pb. Les tailles des amplifiât obtenus ont été estimées à l'aide des deux marqueurs : 50bp et Gene Ruler DNA Ladder Mix de Fermentas. Il est à noter que les champignons (5%) qui n'ont pas donné d'amplifiât ont un ADN trop ancien et la sensibilité de notre méthode ne permet pas à ce jour d'obtenir les produits de PCR attendus.

Sur les gels d'électrophorèse pour nos 7 gels, on visualise toujours une seule bande. Ceci confirme la spécificité de ces amorces pour les champignons. Leurs activités ne sont pas gênées par la présence d'autres sites identiques notamment au niveau des organites cellulaires.

3.3. Le séquençage

Parmi les 115 produits de PCR envoyés à MACROGEN, nous avons reçu 85 séquences interprétables qui ont été choisies pour nos études ultérieures. Ces séquences présentent un seul signal comme présenté dans la Figure 14 page suivante.

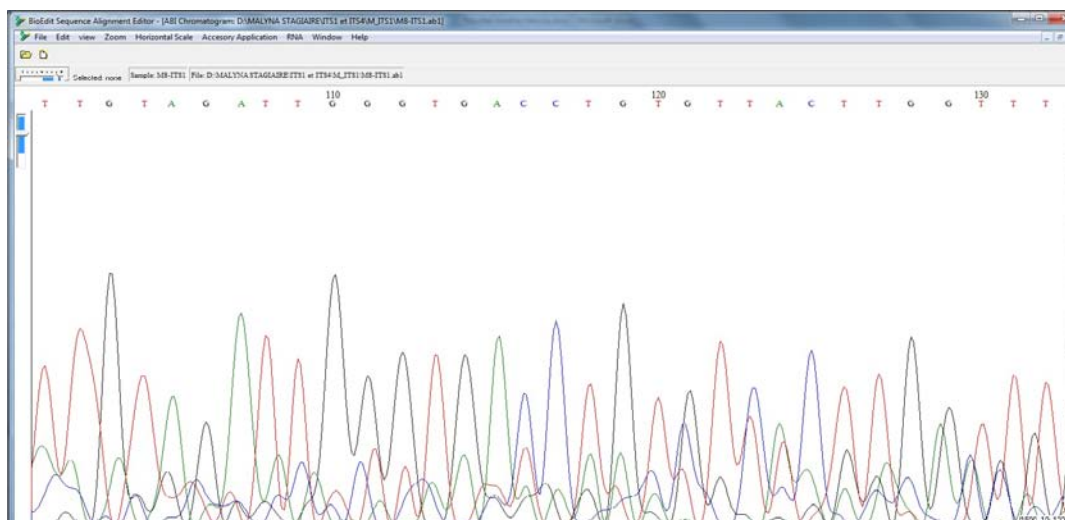
Nous avons obtenu également des séquences illisibles que nous n'arrivons pas à interpréter



(Source personnelle)

Figure 14. Résultat de séquence interprétable lors de la correction avec le logiciel Chromas

Nous observons une seule séquence et un léger de bruit de fond.



(Source personnelle)

Figure 15. Séquence présentant une contamination

Nous observons plusieurs signaux correspondant à plusieurs séquences.

(Figure 15). Ces séquences présentent deux à quatre signaux ce qui témoigne sans doute d'une contamination. Cette contamination pourrait avoir déjà existé sur nos carpophores secs de champignons et de mycéliums purs. Elle pourrait être arrivée aussi au moment des manipulations : l'utilisation des pipettes ou le milieu de culture de mycéliums purs par exemple.

Le nettoyage de carpophores secs de champignons avec de l'alcool avant de commencer toutes manipulations pourrait peut-être éviter la contamination existante.

3.4. Analyse et alignement des séquences

Nos séquences interprétables ont été éditées, corrigées et alignées par le logiciel Chromas, BioEdit et Condoncode Aligner.

Nous avons remarqué que pour éditer et pour corriger les séquences, le logiciel Condoncode Aligner était plus puissant. Ainsi, nous avons réétudié à nouveau nos séquences interprétables par ce logiciel pendant seulement 2 jours au lieu de 30 jours pour les logiciels Chromas et BioEdit. Ce logiciel Condoncode Aligner nous a permis également de faire les séquences consensus sans avoir à utiliser le logiciel Chromas-Pro. Par contre, le logiciel BioEdit est couramment utilisé pour aligner des séquences.

3.5. Analyse des séquences par comparaison (BLAST) avec les banques de données (GENBANK)

Après BLAST nous observons les résultats suivants:

Pour les mycéliums purs : pour les régions ITS1 et ITS2 : 100% de ces séquences possèdent plus de 94% de similarité sur plus de 80% de leur longueur.

Pour les carpophores secs : pour la région ITS1 : 56% de ces séquences possèdent plus de 90% de similarité sur plus de 80% de leur longueur ; pour la région ITS2: 52% de ces séquences possèdent plus de 90% de similarité sur plus de 80% de leur longueur.

Après Blast nous observons les résultats suivants : 26% de ces séquences possédant plus de 90% de similarité sur plus de 80% de leur longueur ont donné le même genre de champignon identifié selon les méthodes morpho-anatomiques ; 57% des séquences n'ont pas donné le même nom de genre de champignon et 17% ont révélé des Ascomycètes indiquant sans doute une contamination de la souche.

Sur les 107 champignons, 42 ont pu être identifiés par BLASTn. La plupart sont des ascomycètes des genres tels que *Xylaria*, *Galactomyces*, *Helicomyces*, *Aspergillus*, *Dipodascus* et *Alternaria*.

Blast identifie également les principaux genres de basidiomycètes tels que *Auricularia*, *Lentinus*, *Gloeophyllum*, *Geastrum*, *Coriolopsis*, *Ganoderma*, *Stereum*, *Pycnoporus*, *Steccherinum*, *Trametes*, *Fomitopsis*, et *Phlebia*. Ces basidiomycètes ont globalement la particularité de dégrader le bois.

Il est à noter que ce travail de comparaisons et de recherche d'homologies des séquences a demandé beaucoup de rigueur et également beaucoup de temps. Il m'a fallu 30 jours pour l'effectuer correctement.

Nous avons constaté que la plupart de nos séquences issues des mycéliums purs provenaient d'Ascomycètes. Actuellement, nous n'avons pas d'explication sur l'origine et le maintien de ces co-cultures au fil des repiquages. Cette diversité taxonomique de contaminants, étroitement associée au mycélium fongique, de manière extracellulaire voire intracellulaire reste à explorer (Zaremski, communication personnelle).

Les recherches de similarité de nos séquences réalisées avec les amorces ITS1 et ITS4, des carpophores secs et des mycéliums purs avec les séquences des banques de données NCBI sont présentées dans les Annexes 3a et 3b. Dans ces annexes figurent le numéro de la souche étudiée, le nom du champignon identifié par le CIRAD et par BLASTn, son numéro d'accension pour le couple d'amorces (ITS1/ITS4), le nombre de paires de bases de chacune de ces séquences (npb) et la longueur de la séquence qui a été comparée par BLAST avec son pourcentage d'identité. Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

Dans nos résultats, les taxons ne donnant pas le même genre que celui attendu et qui ont été identifiés par des mycologues posent problème. En effet, les banques de données internationales comme GENBANK sont sous-représentées pour beaucoup de groupes de champignons, en particulier ceux des régions tropicales. En effet, nous avons vérifié l'existence des séquences de référence pour nos échantillons dans la banque de donnée avant d'effectuer le BLAST. Seulement 5 espèces (*Auricularia auricula*, *Auricularia delicata*,

Gloeophyllum striatum, *Porus tigrinus* et *Schizophyllum commune*) parmi les 67 espèces de nos 107 champignons sont déjà enregistrées comme séquences de références dans GENBANK. Le « GENBANK » du NCBI est la base de données la plus importante et il abrite des dizaines de milliers de séquences représentant des espèces fongiques. Cette déficience de dépôts peut rendre l'identification de séquences fongiques de Guyane difficile sans l'accès à d'autres sources d'informations, comme celles dérivées d'une collection de cultures locales. En conséquence, la précision taxonomique de beaucoup de séquences dans les bases de données peut être remise en question.

Les résultats de BLASTn menés avec nos séquences dans la banque de données de NCBI nous permettent d'envisager l'utilisation de cet outil pour l'identification à *minima* du genre d'une souche pour laquelle nous ne disposons pas d'information quand aux caractéristiques morpho-anatomiques des fructifications, mais pour laquelle nous savons que de nombreuses séquences du genre sont disponibles.

Afin de préciser cette caractérisation taxonomique moléculaire, il paraît souhaitable de compléter ces données de séquences, par exemple d'autres séquences ribosomales nucléaires ou mitochondriales ou en s'appuyant sur d'autres gènes, comme celui codant pour la β tubuline (Patrick J. et *al.* 2000).

III. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Afin de caractériser les 107 champignons lignivores de Guyane se développant dans un écosystème particulier, nous avons développé une méthode rapide et discriminante basée sur l'analyse de la diversité de séquences des ITS de l'ADN ribosomal utilisant le couple d'amorces ITS1 et ITS4.

Indépendamment de cette première analyse, une caractérisation morphologiques macro et microscopiques des carpophores nécessaires à l'identification des genres et espèces, a été réalisée.

L'adaptation du kit InvitroGen pour végétaux supérieurs permet d'extraire l'ADN des champignons, ce qui nous a permis d'obtenir, avec la plupart des souches étudiées, un amplifiât d'ITS d'une taille d'environ 700 paires de bases.

L'analyse par BLASTn des séquences obtenues nous a permis de déterminer les limites de cette méthode pour la caractérisation de ces souches. L'utilisation de cette méthode sur ce fragment présente plusieurs avantages, notamment une bonne reproductibilité, mais la qualité et le manque des séquences fournies par la banque de données influent beaucoup sur l'analyse phylogénétique et ils ne sont pas satisfaisants pour notre étude.

Cette caractérisation taxonomique de souches de Guyane de la collection du CIRAD nous permettra d'envisager l'exploration des liens phylogénétiques entre espèces de champignons dégradant le bois et notamment de tester un éventuel lien entre des séquences d'ADN non codantes et des séquences codantes pour des activités enzymatiques. Elle nous permettra de poser les bases méthodologiques pour le développement d'un outil de détection précoce de champignons dans un bois et d'un outil pour la traçabilité des bois de Guyane.

Les résultats de ce stage ne répondent pas encore à nos nombreux objectifs. Encore beaucoup de travail ultérieur sera nécessaire comme l'étude de l'effet de l'évolution de la taxonomie fongique sur la modification des noms scientifiques. Enfin, à la suite de tous ces travaux nous pourrons envisager l'enrichissement des banques de données avec les séquences de nos champignons. Ces séquences pourront être utilisées par la suite pour d'autres études.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ouvrages :

- Eaton R.A. et Hale M.D.C. 1993. Wood decay, pests and protection. Chapman and Hall, London. 546 p.
- Fougerousse M. 1976. Rappels de mycologie générale et de systématique mycologique. 54 p.
- Latreille C., Voirollet .D, Penez J.P, Dewynter M., Jay P.O. 2004. Guide de reconnaissance des arbres de Guyane. 374 p.
- Joseph P. et Lise C. 2009. Ecosystèmes forestiers des Caraïbes. Edition KARTHALA. 174p.
- Zaremski A. 2005. Les Aphyllophorales impliquées dans la dégradation du bois : caractérisation taxinomique, phylogénie et détection précoce des champignons dans le bois. 148 p.

Publications :

- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. et Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-402.
- Anderson I.C. et Cairney J.W. G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology.* **6 (8)**: 769-779.
- Gardes M. et Bruns T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* **2**:113-118.
- Guerin-Laguet A., Conventi S., Ruiz G., Plassard C. et Mousain D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of an rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza.* **13**:17-25.

- Martin F., Diez J., Dell B. et Delaruelle C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytol.* **153**:345-357.
- Mitchell J.I. et Zuccaro A. 2006. Sequence: the environment and fungi. *Mycologist.* **20**: 62-74.
- Mullis K.B. et Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalized chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
- Patrick J. Keeling, Melissa A. Luker et Jeffrey D. Palmer. 2000. Evidence from Beta-Tubulin Phylogeny that *Microsporidia* Evolved from Within the Fungi. *Mol. Biol. Evol.* **17**(1):23-31.
- Schmidt O. et Moreth U. 2000. Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as the diagnostic tool for *Serpula lacrymans*. *Mycol. Res.* **14** (I): 69-72.
- White T.J., Bruns T., Lee S. et Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dans : PCR protocols: a Guide to Methods and Applications, (eds.) Innis M.A., Gelfand D. H., Sninsky J.J. et White T.J. Academic Press Inc., San Diego, Californie, 315-322.

Sites internet:

- <http://fr.wikipedia.org/wiki/Invitrogen/>
- <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- <http://www.c2m-expertise-diagnostics-immobiliers.fr/>
- <http://www.invitrogen.com/>
- <http://www.ncbi.org/>
- <http://www.macrogen.com/>

Annexe 1: Protocole de l'extraction de l'ADN total

Préparation de lysat de champignons

On doit tout d'abord préparer les échantillons dont on veut faire l'extraction, préparer le bain marie à température 55°C et préparer la plaque chauffante à température 94°C. Un tube de 100mg d'échantillon est divisé en deux tubes de 50mg. Après avoir bien équilibré, on plonge les échantillons bien fermés dans de l'azote liquide pendant 3mn. Puis on les récupère, les ouvre afin de les refermer avec de l'aluminium pour les chauffer à la plaque chauffante pendant 3mn. Cette étape est faite trois fois. Une fois cette étape terminée, on ajoute 250µl du R2 puis les passer au vortex afin de bien mélanger. Puis on met 2 billes dans chaque échantillon et on les récupère dans un broyeur à billes à la fréquence maximum de 30vitesse/s. Après il faut ajouter 15µl de SDS à 20% et 15µl de ARNase (20 mg/ml) pour lyser et les incuber tout de suite dans le bain mari à la température de 55°C pendant 15mn pour compléter la lyse. Puis les échantillons sont centrifugés à 15000g (gravité par minute) à la température ambiante pendant 5mn afin d'éliminer les matériels insolubles.

Purification l'extraction de l'ADN totaux

Ensuite ne prélever que le lysat et le transférer dans les nouveaux tubes stériles de 1,5 ml. Ajouter 100µl du N2 et passe-les au vortex. Centrifuger à 15000rpm à la température ambiante pendant 5 mn la deuxième fois pour éliminer le lysat clair. Ensuite il ne faut prélever que 250µl de lysat de chaque tube d'échantillon et les mettre dans de nouveaux tubes stériles de 1,5 ml. Ajouter 375µl du B4 dans chaque tube et le passer au vortex. Transférer le lysat aux colonnes et centrifuger à la speed vitesse 10000rpm à la température ambiante pendant 1mn. L'ADN est retenu maintenant dans la colonne. Puis les colonnes sont transférées aux nouveaux tubes stériles de 2ml. On ajoute 500µl du W4. On transfère de nouveau les colonnes aux nouveaux tubes stériles de 2ml et on ajoute 500µl du W5. Les lavages successifs servent à purifier l'ADN toujours accroché à la colonne. On centrifuge à speed vitesse 10000g à la température ambiante pendant 1mn. On transfère les colonnes aux deux nouveaux tubes stériles de 2ml puis centrifuger à 15000g à la température ambiante pendant 2 mn pour éliminer le W5 qui reste éventuellement dans la colonne. On transfère de nouveau les colonnes aux nouveaux tubes stériles de 1,5 ml, puis on ajoute 100µl d'E1. On centrifuge à 15000g à la température ambiante pendant 1 mn. L'ADN se trouve maintenant dans le tube de 1,5 ml. Enfin, les tubes contenant de l'ADN sont conservés à une température à -20°C.

Annexe 2a : Liste des 80 carpophores secs de Guyane de la collection du CIRAD.

N°	Nom de carpophore CIRAD	Réf CIRAD	Origine
1C	Amauroderma omphalodes (Berk.)		Guyane 22 - Orstom
2C	Antrodiella liebmanii (Fr.)		Guyane Piste St Elie - Carrière de Cabasson (1982)
3C	Aquascypha hydrophora (Berk.) Reid	2167	Guyane (1982) - Orstom
4C	Auricularia polytricha (Mont.) Sacc.		Guyane (1982) - Cabasson et piste d'Elie
5C	Auricularia auricula		Guyane (1985)
6C	Auricularia mesenterica Retz	2063	Guyane (1982) - Orstom
7C	Auricularia sp (peut être) delicata		Guyane (1982)
8C	Corioloopsis byrsina (Mont.) Ryv.		Guyane Carrière de Cabasson (1982)
9C	Corioloopsis caferata (Berk.) Murr.		Guyane (Juin 1975) - Isol 1099
10C	Corioloopsis fuhrocinnurea Murr.		Guyane maison du Threl (1982) - Sur poteau - Isol 1374 (p. fibreuse)
11C	Coriolus sector Fr. Pat.		Guyane (1892) - Piste CTFT - Sur autoroute
12C	Cotylidia aurantiaca (Pers.) Welden		Guyane (1982) - Sur bois pourri - Orstom
13C	Cyathus minbatus Tulasne		Guyane - Orstom. Sur petit bois inclus dans carrière
14C	Cynematoderma dendriticum (Pers.) Reid		Guyane St Laurent (1982) - Isol 1350
15C	Cynematoderma dendriticum (Pers.) Reid		Guyane (Juin 1975) - Isol 1101
16C	Favolus		Guyane
17C	Ganoderma	2591	Guyane - Orstom
18C	Ganoderma sp	181 B	Guyane - Orstom (1976) - En mycothèque
19C	Ganoderma lucidum (Leyss et Fr.) Karst.		Guyane Piste d'Elie (1982) - Sur Wafa
20C	Ganoderma testaceum (Lév)		Guyane Piste St Elie (1982) - Bille au sol
21C	G. ericetorum		Guyane (1982) Chantir SE - Isol 1352
22C	Gloeophyllum striatum (Fr.) Murr.	92 F	Guyane Piste St Elie (1982) - sur Angélique - Isol 11
23C	Gloeophyllum striatum (Fr.) Murr.	92 E	Guyane St Laurent (1982)
24C	Gloeophyllum striatum (Fr.) Murr.		Guyane St Laurent - Isol 1349
25C	Gloeophyllum striatum (Swartz. Fr.) Murr.	155 B	Guyane (Juin 1975) - Isol 1104
26C	Geastrum sp (saccatum ou velutinum)		Guyane - Carrière de Cabasson (1982) - une branche au sol
27C	Gyrodontium cf flavidium (Lloyd) Reid	229 A	Guyane Montsinéry (1982) - sur Pareouri
28C	Hexagonia hyduoïdes Fr. Fidalgo		Guyane - Orstom
29C	Hexagonia hyduoïdes Fr. Fidalgo	200 D	Guyane (1982) - Kourou Poteau case thiel - Isol 1351 - en mycothèque
30C	Hexagonia hyduoïdes Fr. Fidalgo		Guyane St Laurent (1982) - Isol 1353
31C	Hexagonia hyduoïdes Fr. Fidalgo		Guyane (1982) - Carrière de Cabasson sur bois au sol
32C	Hypoxylon sclerophaeum B et C		Guyane Piste St Elie (1982) - Sur bille au sol - Isol n°16
33C	Laxitextum bicolor (Pers. Fr.) Lentz		Guyane St Laurent (1982) - Isol 1356
34C	Lentinus nicotianus Berk.	197 A	Guyane Kourou (Juin 1975) - Isol 1092 - Sur rondelles de bois surtout de pavage - En mycothèque
35C	Lentinus nicotianus Berk.	197 B	Guyane (Juin 1975) - Isol 1107 - En mycothèque
36C	Lentinus tigrinus	183 C	Guyane St Laurent - En mycothèque
37C	Lentinus tigrinus	183 B	Guyane (Juin 1975) - Isol 1109
38C	Lenzites elegans Fr. Pat.	18 E	Guyane (1982) Piste St Elie - En mycothèque
39C	Lenzites elegans Fr. Pat.		Guyane (1982) Piste St Elie - Sur autoroute
40C	Loweporus (vraisemblablement)		Guyane Piste St Elie (1982)
41C	Marasmius rhyssophyllus		Guyane Carrière de Cabasson (1982) - Isol 2712
42C	Microporus xanthopus (Fr.) Kunt		Guyane (Juin 1975) - Isol 1094

43C	<i>Perenniporia</i> sp.		Guyane (1973) - Sur porte extérieure - Isol 1094
44C	<i>Phellinus</i> sp.		Guyane Kourou (Juin 1975) - Sur escalier extérieur - Isol 1093
45C	<i>Phellinus</i> sp.		Guyane Kourou (1976) - Sur piquet d'Angélique - Isol 1182
46C	<i>Phellinus</i> sp. cf <i>punctatus</i>		Guyane Piste St Elie (1982)
47C	<i>Pogonomyces hydnoïdes</i> (Swartz ex Fr.) Murr.	155 B	Guyane (Juin 1975) - Isol 1106
48C	<i>Pogonomyces hydnoïdes</i> (Swartz ex Fr.) Murr.	200 C	Guyane St Laurent (1976) - Isol 1185
49C	<i>Polyporus caferatus</i> Berk.		Guyane Piste St Elie (1982) - Isol 4
50C	<i>Polyporus caferatus</i> Berk.		Guyane Piste St Elie (1982) - Bois au sol - Isol 3
51C	<i>Polyporus durescens</i> Overholts	202 B	Guyane St Laurent (1982)
52C	<i>Polyporus durescens</i> Overholts	185 B	Guyane (1976) - Isol 1188
53C	<i>Polyporus durescens</i> Overholts	202 F	Guyane Piste St Elie (1982) - Isol 6
54C	<i>Polyporus durescens</i> Overholts	202 C	Guyane St Laurent (1982) - Isol 1370
55C	<i>Polyporus durescens</i> Overholts	202 E	Guyane St Laurent (1982) - Isol 1379
56C	<i>Polyporus durescens</i> Overholts	202 D	Guyane St Laurent (1982) - Isol 1372
57C	<i>Polyporus guianensis</i> Mont		Guyane Carrière du Cabasson (1982) - Bois au sol - Isol 22
58C	<i>Polyporus tricholoma</i> Montagne		Guyane Piste St Elie
59C	<i>Polyporus versicolor</i> L. Fr.		Guyane
59			
Cbis	<i>Porus tigrinus</i> (Bull. ex Fr.) Surg	183 D	Guyane Piste St Elie (1982) - CTFT sur cèdre
60C	<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryv.		Guyane (1982) - Chantier "Vandé" - Isol 1354
61C	<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryv.		Guyane St Laurent (1982) - Isol 1363
62C	<i>Rigidoporus lineatus</i> (Pers.) Ryv.	230 B	Guyane Montoinery (1982) - Isol 1375
63C	<i>Rigidoporus microporus</i> (Fr.)	51 E	Guyane Montoinery (1982) - Isol 1373
64C	<i>Schizophyllum commune</i>		Guyane (1982) - Sur bille - CTFT Kourou
65C	<i>Stereum cruentata</i>	198 A et B	Guyane Kourou (Juin 1975) - Isol 1102
66C	<i>Stereum</i> (groupe) <i>ostrea</i> (Blume Nees ex Fr.) Fr.	171 B	Guyane Piste St Elie (1982)
67C	<i>Stereum papyrium</i>		Guyane (1982)
68C	<i>Trametes cingulata</i>		Guyane (1982) - Sur Wafa
69C	<i>Trametes cingulata</i> forme obscure		Guyane St Laurent (1976) - Isol 1171
70C	<i>Trametes corrugata</i> (Pers.) Bres	175 B	Guyane (1976) - Isol 1176 - Ech n°4
71C	<i>Trametes corrugata</i> (Pers.) Bres		Guyane St Laurent (2) (1982) - Isol 1376
72C	<i>Trametes corrugata</i> (Pers.) Bres		Guyane (1976) - Isol 1179 - Ech "4B"
73C	<i>Trametes corrugata</i> (Pers.) Bres	19 G	Guyane St Laurent (1982) - Isol 1368
74C	<i>Trametes modesta</i> (Fr.) Ryv		Guyane Piste St Elie (1982) - Sur Bocco
75C	<i>Trametes</i> sp.		Guyane (1972) - Fructification - Isol 982
76C	<i>Tremellogaster</i> sp.		Guyane Piste St Elie (1982) - Sur autoroute
77C	<i>Thamnomycetes chordalis</i> Fr.		Guyane Carrière de Cabasson (1982) - Sur bois mort
78C	<i>Xylaria obovata</i> (Berk.) Fr.		Guyane Piste St Elie (1982) - Sur bois mort
79C	<i>Xylaria</i> sp.		Guyane Carrière de Cabasson (1982) - Sur bois mort
80C	<i>Xylaria</i> species		Guyane Piste St Elie (1982) - Sur bois mort

Annexe 2b : Liste des 27 échantillons de mycéliums purs de Guyane de la collection de CIRAD.

N° Ly	N° Cirad	Nom du souche pure du Cirad
974	1	<i>Pnycoporellus fulgeus</i>
974	2	<i>Pnycoporellus fulgeus</i>
C35.219.36	3	<i>Ganoderma weberianus</i>
974	4	<i>Pnycoporellus fulgeus</i>
276	5	<i>Antrodia albobrunnea</i>
4072	6	<i>Tyromyces aortie</i>
356	7	<i>Antrodia albida</i>
839	8	<i>Poria albipellicula</i>
839	9	<i>Poria albipellicula</i>
839	10	<i>Poria albipellicula</i>
839	11	<i>Poria albipellicula</i>
851	12	<i>Fomitopsis palustris</i>
851	13	<i>Fomitopsis palustris</i>
851	14	<i>Fomitopsis palustris</i>
851	15	<i>Fomitopsis palustris</i>
274	16	<i>Poria byssina</i>
274	17	<i>Poria byssina</i>
4353	18	<i>Ganoderma atkensonii</i>
4353	19	<i>Ganoderma atkensonii</i>
4353	20	<i>Ganoderma atkensonii</i>
194	21	<i>Antrodia malicola</i>
194	22	<i>Antrodia malicola</i>
4072	23	<i>Tyromyces aortie</i>
4072	24	<i>Tyromyces aortie</i>
527	25	<i>Poria taxicola</i>
527	26	<i>Poria taxicola</i>
850	27	<i>Antrodiella overholtsii</i>

Annexe 3a : Les recherches de similarité de nos séquences ITS1 des carpophores secs avec les séquences des banques de données NCBI.

Dans cette annexe figurent le numéro CIRAD de la souche étudiée, le nom du champignon identifié par le CIRAD, par le BLASTn, son numéro d'accès, le nombre de paires de bases de chacune de ces séquences (npb) et la longueur de la séquence qui a été comparée par BLAST avec son pourcentage d'identité noté entre parenthèses.

ITS1	N° accession	Identification BLAST	npb	Identité	(%)	N°		ITS4	N° accession	Identification BLAST	npb	Identité	(%)
						CIRAD	Identification CIRAD						
M2	AB615232	Auricularia auricula	571	379/513	74	5C	Auricularia auricula	M47	AF291268	Auricularia auricula	517	364/377	97
M4	AF291269	Auricularia delicata	492	429/530	81	7C	Auricularia delicata	M49	AF291269	Auricularia delicata	501	451/493	91
M13	HM536092	Gloeophyllum striatum	541	329/478	69	22C	Gloeophyllum striatum (Fr.) Murr.	M58	HM536092	Gloeophyllum striatum	547	529/545	97
M14	HM536092	Gloeophyllum striatum	461	450/460	98	24C	Gloeophyllum striatum (Fr.) Murr.	M59	HM536092	Gloeophyllum striatum	560	548/561	98
M15	HM536092	Gloeophyllum striatum	538	523/536	98	25C	Gloeophyllum striatum (Swartz. Fr.) Murr.	M60	HM536092	Gloeophyllum striatum	531	518/531	98
M33	GU207295	Lentinus crinitus	603	589/589	100	59Cbis	Porus tigrinus (Bull. ex Fr.) Surg	M78	GU207295	Lentinus crinitus	623	620/620	100
						64C	Schizophyllum commune	M82	FJ426395	Schizophyllum commune	590	587/590	99
M6	AB158316	Coriolopsis caperata	591	589/590	99	10C	Coriolopsis fuhrocinnurea Murr.	M51	JF283779	Coriolopsis caperata	591	247/315	78
M16	EU784225	Geastrum coronatum	551	480/553	87	26C	Geastrum sp (saccatum ou velutinum)	M61	EU784225	Geastrum coronatum	551	472/554	85
M20	AB495008	Xylaria sp.	543	484/543	89	32C	Hypoxylon sclerophaeum B et C	M65	AB495008	Xylaria sp.	515	472/530	89
M22	GU207276	Lentinus swartzii	463	442/460	96	34C	Lentinus nicotianus Berk.	M67	GU207278	Lentinus swartzii	612	116/157	74
M10	HM536092	Gloeophyllum striatum	397	267/362	74	17C	Ganoderma	M55	HM136871	Fomes sp.	376	290/326	89
	GQ354271	Gloeophyllum abietinum	397	214/293	73				FR686556	Ganoderma applanatum	376	277/325	85
	AJ420946	Gloeophyllum sepiarium	397	184/242	76				HQ896245	Dichomitus albidofuscus	376	273/319	86
	HM536097	Neolentinus kauffmanii	397	174/229	76				GU731565	Lenzites elegans	376	257/292	83
M18	HM136871	Fomes sp.	580	563/565	99	29C	Hexagonia hyduoïdes Fr. Fidalgo	M63	HM136871	Fomes sp.	595	586/588	99
	AY849305	Fomes fomentarius	580	530/586	90				FN539043	Fomes fomentarius	595	536/595	90
	AJ608713	Ganoderma philippii	580	532/591	90				FJ378651	Ganoderma pseudoferreum	595	539/600	90
	AJ536663	Ganoderma sp.	580	531/589	90				FJ572269	Pleurotus nebrodensis	595	536/597	90
	EF060006	Ganoderma lipsiense	580	533/596	89				AJ537410	Rigidoporus sp.	595	532/594	90
M21	AY916484	Helicoma sp.	529	484/529	91	33C	Laxitextum bicolor (Pers. Fr.) Lentz	M66	AY916484	Helicoma sp.	566	495/542	91
	AY916483	Helicomycetes lilliputeus	529	471/527	89				AY916481	Helicomycetes roseus	566	497/542	92
	AY916477	Helicosporium indicum	529	469/559	84				AY916482	Tubeufia sp.	566	483/552	88
	DQ341095	Tubeufia cylindrothecia	529	464/555	84				GQ856145	Acanthostigma multiseptatum	566	453/543	83

M23	HM245784	Panus sp.	621	584/588	99	35C	Lentinus nicotianus Berk.	M68	HM245784	Panus sp.	617	610/616	90
	GQ849478	Lentinus sp.	621	554/624	89				EF694648	Polyporales sp.	617	606/611	87
	FN907915	Cerrena unicolor	621	508/626	81				HQ728307	Spongipellis litschaueri	617	488/607	89
	AY968078	Homobasidiomycete sp.	621	507/626	81				EF577058	Cerrena unicolor	617	496/623	86
	FN907921	Antrodiella pallescens	621	406/497	82				HM536092	Gloeophyllum striatum	566	515/563	86
M29	HQ248221	Fomitopsis meliae	616	605/610	99	52C	Polyporus durescens Overholts	M74	AB540581	Fomitopsis cf.	625	609/626	97
	AB540581	Fomitopsis cf.	616	595/609	98				EU015881	Fomitopsis sp.	625	588/638	92
	HM126455	Fomitopsis sp.	616	572/621	92				GQ373177	Basidiomycota sp.	625	577/629	92
	AB604156	Fomitopsis palustris	616	563/610	92				FJ617303	Antrodia wangii	625	568/622	91
	FR717226	Fomitopsis pinicola	616	571/625	91				HQ248221	Fomitopsis meliae	605	600/606	99
M30	HQ248221	Fomitopsis meliae	601	599/604	99	54C	Polyporus durescens Overholts	M75	GQ982889	Fomitopsis cf.	605	593/608	98
	HM126460	Fomitopsis sp.	601	557/595	94				HM126460	Fomitopsis sp.	605	569/618	92
	FJ372680	Fomitopsis cf.	601	554/593	93				GQ373177	Basidiomycota sp.	605	568/620	92
	AB604156	Fomitopsis palustris	601	546/584	93				FJ617303	Antrodia wangii	605	564/618	91
	FR717226	Fomitopsis pinicola	601	555/599	93				FJ873583	Candida sp.	352	226/239	95
M31	AB566306	Ascomycota sp.	325	163/176	93	55C	Polyporus durescens Overholts	M76	AY838940	Geotrichum gigas	352	292/331	88
	AB083082	Dipodascus capitatus	325	163/176	93				AB083082	Dipodascus capitatus	352	256/299	86
	AB300502	Dipodascus tetrasporus	325	204/278	73				HQ248221	Fomitopsis meliae	622	612/617	99
	EF643580	Dipodascus australiensis	325	203/273	74				EU647877	Auricularia sp.	298	254/297	79
M32	HQ248221	Fomitopsis meliae	600	595/600	99	56C	Polyporus durescens Overholts	M77	GQ982889	Fomitopsis cf.	622	605/619	98
	FR717226	Fomitopsis pinicola	600	549/593	93				HM126460	Fomitopsis sp.	622	581/629	92
	FM872470	Antrodia sp.	600	528/602	88				AB604156	Fomitopsis palustris	622	581/629	92
	FM202496	Physisporinus vitreus	223	190/222	86				FM202496	Physisporinus vitreus	519	487/520	94
	FJ372680	Fomitopsis cf.	601	554/593	93				GQ373177	Basidiomycota sp.	605	568/620	92
	AB604156	Fomitopsis palustris	601	546/584	93				FJ617303	Antrodia wangii	605	564/618	91
	FR717226	Fomitopsis pinicola	601	555/599	93				FJ873583	Candida sp.	352	226/239	95
M34	AB512335	Mycena sp.	223	184/223	83	61C	Rigidoporus lineatus (Pers.) Ryv.	M79	AB512335	Mycena sp.	519	479/521	92
	HQ641118	Irpex lacteus	223	68/76	89				GQ355959	Meripilus giganteus	519	447/514	87
	FJ462765	Perenniporia subacida	223	68/76	86				AB470242	Polyporales sp.	519	434/519	84
	FM202496	Physisporinus vitreus	590	585/587	99				AM231908	Gloeoporus taxicola	519	339/418	81
	AB512335	Mycena sp.	590	566/593	95				FM202496	Physisporinus vitreus	583	547/548	99
M35	AB470242	Polyporales sp.	590	468/544	86	62C	Rigidoporus lineatus (Pers.) Ryv.	M80	AB512335	Mycena sp.	583	556/584	85

M40	FR686567	Meripilus giganteus	590	493/608	81	68C	Trametes cingulata	M85	GQ355959	Meripilus giganteus	583	505/592	85
	AY787680	Phlebia sp.	590	373/431	87				AB470242	Polyporales sp.	583	497/592	84
	HM245784	Panus sp.	371	127/140	91				FJ903378	Basidiomycota sp.	583	468/569	82
	AB615231	Auricularia fuscossuccinea	371	129/167	77				AM901671	Aspergillus sp.	559	520/561	93
	EF652043	Aspergillus restrictus	546	437/445	98				FJ860062	Dioscorea alata	559	519/564	92
	EF652086	Eurotium xerophilum	546	415/450	92				JF439500	Penicillium sp.	559	484/561	86
	FR848825	Eurotium amstelodami	546	403/444	91				AY373927	Penicillium raistrickii	559	482/562	86
M42	JF440580	Stereum sanguinolentum	328	122/166	73	76C	Tremellogaster sp.	M87	HQ731622	Neosartorya sp.	559	485/566	86
	FN539052	Stereum rugosum	328	122/166	73				EU273556	Stereum sanguinolentum	580	442/600	74
	AM269811	Stereum rugosum	328	122/166	73				FN539063	Stereum hirsutum	580	431/595	72
	AM084462	Basidiomycete sp.	328	122/166	73				AF005060	Basidiomycete sp.	580	422/590	72
	EU680513	Diversisporales sp.	328	122/166	73				AB531458	Xylobolus spectabilis	580	153/187	82
	EF652039	Aspergillus conicus	539	535/537	99				AF506448	Gloeomyces graminicola	580	147/186	79
	EF652038	Aspergillus sp.	539	531/537	99				AM901671	Aspergillus sp.	557	547/558	98
M43	FJ860062	Dioscorea alata	539	525/540	97	77C	Thamnomycetes chordalis Fr.	M88	FJ860062	Dioscorea alata	557	544/561	97
	FR727122	Aspergillus restrictus	539	516/531	97				AM176741	Aspergillus restric	557	524/540	97
	EF652046	Aspergillus vitricola	539	507/567	89				AY213679	Penicillium turbatum	557	504/560	90
M8	FM202496	Physisporinus vitreus	470	459/465	99	13C	Cyathus minbatus Tulasme						
	AB512335	Mycena sp.	470	440/468	94								
	GQ355959	Meripilus giganteus	470	405/479	85								
	FJ903378	Basidiomycota sp.	470	316/363	87								
	L43380	Phlebia centrifuga	470	268/313	86								
M11	DQ667968	Galactomyces sp.	181	150/168	89	18C	Ganoderma sp						
	DQ148946	Galactomyces geotrichum	181	145/162	90								
M26	HM777040	Dipodascus sp.	181	145/169	86	42C	Microporus xanthopus (Fr.) Kunt						
	FN376415	Geotrichum candidum	181	145/169	86								
	EF652038	Aspergillus sp.	291	273/288	95								
	FR718462	Ascomycota sp.	291	272/288	94								
	FR727122	Aspergillus restrictus	291	270/288	94								
	FR727118	Aspergillus wentii	291	251/291	86								
	FJ537089	Aspergillus wenti	291	251/291	86								

M38	HM448450	Auricularia polytricha	371	129/167	77	65C	Stereum cruentata						
	AF291269	Auricularia delicata	371	127/165	77								
	HQ441577	Oliveonia pauxilla	371	128/167	77								
	AF291269	Auricularia delicate	378	291/299	97								
	AB615229	Auricularia fuscusuccinea	378	287/302	95								
M39	HM448450	Auricularia polytricha	378	287/302	95	67C	Stereum cruentata						
	DQ200918	Auricularia sp.	378	279/299	93								
	AF291271	Auricularia mesenterica	378	280/301	93								
	EF652038	Aspergillus sp.	546	437/441	99								
	EF652039	Aspergillus conicus	546	437/443	99								
						39C	Lenzites elegans Fr. Pat.	M69	AY497555	Gloeophyllum sepiarium	566	502/566	89
									HM536093	Gloeophyllum subferrugineum	566	503/568	89
									HM536094	Gloeophyllum trabeum	566	502/568	88

Annexe 3b : Résultats de BLAST de 27 mycéliums purs de la collection du CIRAD.

N° At	Nom du champignon CIRAD	ITS1	N° accession	Nom du blast	npb.	Identité(séquences CIRAD/séquences BLAST)	%
2	Pnycoporellus fulgeus	M133	GU584951	Alternaria sp.	512	512/512	100
			HQ115732	Alternaria alternata	512	512/512	100
			EU054406	Fungal endophyte sp.	512	512/512	100
			AY154682	Alternaria alternata	512	512/512	100
			FR846400	Alternaria compacta	512	512/513	99
3	Ganoderma weberianus	M134	AY569451	Ganoderma weberianum	591	575/579	99
7	Antrodia albida	M138	AY569451	Ganoderma weberianum	586	573/577	99
			EU089969	Ganoderma sp.	586	575/587	98
			AM269778	Ganoderma resinaceum	586	554/578	96
			AM269778	Ganoderma resinaceum	586	546/570	96
			AM269774	Ganoderma pfeifferi	586	546/570	96
8	Poria albipellicula	M139	JF773569	Alternaria tenuissima	486	486/486	100
			JF439449	Alternaria brassicae	486	486/486	100
			JF694748	Alternaria sp.	486	486/486	100
10	Poria albipellicula	M140	JF439449	Alternaria brassicae	514	513/513	100
			JF742669	Alternaria sp.	514	513/513	100
			FR846400	Alternaria compacta	514	513/513	100
			HQ647310	Alternaria tenuissima	514	513/513	100
13	Fomitopsis palustris	M141	GU586847	Epicoccum nigrum	492	492/492	100
			HQ630972	Epicoccum sp.	492	492/492	100
			GQ996091	Fungal sp.	492	492/492	100
			AB470841	Phyllosticta ligustri	492	492/492	100
			EU520180	Pleurotus ostreatus	492	490/493	99
16	Poria byssina	M142	HQ914865	Alternaria sp.	518	518/518	100
			FR846400	Alternaria compacta	518	518/518	100
			GQ121322	Alternaria alternata	518	518/518	100
			AB470908	Bionectria ochroleuca	518	518/518	100
			AY880681	Lycium ruthenicum	518	518/518	100
17	Poria byssina	M166	FJ949080	Alternaria tenuissima	523	523/523	100
			JF439447	Alternaria brassicae	523	523/524	99
			JF694748	Alternaria sp.	523	523/524	99
			HM210840	Alternaria alternata	523	522/523	99
			FJ426387	Alternaria ochroleuca	523	522/523	99
18	Ganoderma atkensonii	M143	EU486458	Ganoderma carnosum	591	591/597	99
			AY884176	Ganoderma lucidum	591	588/596	99
			EF060006	Ganoderma lipsiense	591	571/598	95
			AY968082	Trametes sp.	591	569/597	95
			AJ608713	Ganoderma philippii	591	560/587	95
19	Ganoderma atkensonii	M167	GU731557	Ganoderma carnosum	575	575/575	100
			AM269773	Ganoderma lucidum	575	567/574	99
			GU731555	Ganoderma adspersum	575	555/582	95
			EF060006	Ganoderma lipsiense	575	555/582	95
			AY968082	Trametes sp.	575	554/582	95
20	Ganoderma atkensonii	M168	EU486458	Ganoderma carnosum	582	582/583	99

			AY884176	Ganoderma lucidum	582	580/582	99
			EF060006	Ganoderma lipsiense	582	561/585	96
			AY884178	Ganoderma applanatum	582	561/585	96
			FJ374875	Ganoderma pseudoferreum	582	556/583	95
21	Antrodia malicola	M144	GU731545	Antrodia malicola	599	597/599	99
22	Antrodia malicola	M169	GU731545	Antrodia malicola	604	603/604	99
23	Tyromyces aortie	M145	GU731545	Antrodia malicola	607	599/602	99
			EU427048	Phellinus igniarius	607	561/595	94
			DQ491413	Fomitopsis cajanderi	607	534/597	89

N° At	Nom du champignon CIRAD	ITS4	N° accession	Nom du blast	npb.	Identité(séquences CIRAD/séquences	%
						BLAST)	
2	Pnycoporellus fulgeus	M148	JF819157	Alternaria sp.	482	482/482	100
			HM008926	Alternaria alternata	482	482/482	100
			HQ402558	Alternaria tenuissima	482	482/482	100
			HM013817	Rheum palmatum	482	482/482	100
3	Ganoderma weberianus	M149	AY569451	Ganoderma weberianum	586	581/585	99
7	Antrodia albida	M153	AY569451	Ganoderma weberianum	586	581/585	99
			GU451247	Ganoderma resinaceum	586	569/591	96
			AM906061	Ganoderma resinaceum	586	568/591	96
			EU520249	Heridium erinaceum	586	566/589	96
			AM269774	Ganoderma pfeifferi	586	567/591	96
8	Poria albipellicula	M154	HQ317498	Alternaria sp.	492	492/492	100
			HM052815	Alternaria alternata	492	492/492	100
			AY880681	Lycium ruthenicum	492	492/492	100
			HQ166294	Ascomycota sp.	492	491/491	100
			HM013817	Rheum palmatum	492	491/491	100
10	Poria albipellicula	M155	HQ014678	Alternaria alternata	524	524/524	100
			GU584951	Alternaria sp.	524	524/524	100
			EU098120	Alternaria arborescens	524	524/524	100
			AF397227	Alternaria tenuissima	524	524/524	100
			AF314581	Alternaria gaisen	524	524/524	100
13	Fomitopsis palustris	M156	JF440590	Epicoccum nigrum	492	491/491	100
			HQ630972	Epicoccum sp.	492	488/488	100
			EU108785	Antarctic fungal sp.	492	488/488	100
16	Poria byssina	M157	HQ317498	Alternaria sp.	492	492/492	100
			HM052815	Alternaria alternata	492	492/492	100
			HM051071	Alternaria tenuissima	492	492/492	100
			EU520187	Coniothyrium concentricum	492	492/492	100
			AY880681	Lycium ruthenicum	492	492/492	100
17	Poria byssina	M175	HM008929	Alternaria sp.	519	519/519	100
			HM051071	Alternaria tenuissima	519	519/519	100
			HM013817	Rheum palmatum	519	519/520	99
18	Ganoderma atkinsonii	M158	GU731557	Ganoderma carnosum	595	578/578	100

			EU498090	Ganoderma lucidum	595	593/600	99
			AY968082	Trametes sp.	595	571/601	95
			AJ627584	Ganoderma philippii	595	571/601	95
			EU021457	Ganoderma tropicum	595	568/603	94
19	Ganoderma atkensonii	M176	GU731557	Ganoderma carnosum	586	579/579	100
			EU498090	Ganoderma lucidum	586	585/591	99
			DQ425011	Ganoderma oerstedii	586	543/549	99
			AJ608710	Ganoderma philippii	586	558/591	94
			FJ392284	Ganoderma pseudoferreum	586	561/591	95
20	Ganoderma atkensonii	M177	EU498090	Ganoderma lucidum	589	588/589	99
			EU486458	Ganoderma carnosum	589	587/590	99
			FJ392284	Ganoderma pseudoferreum	586	561/591	95
			GU451247	Ganoderma resinaceum	589	560/591	95
			FJ478127	Ganoderma ramosissimum	589	560/591	95
21	Antrodia malicola	M159	GU731545	Antrodia malicola	607	566/569	99
22	Antrodia malicola	M178	GU319996	Antrodia malicola	607	581/610	95
23	Tyromyces aortie	M160	GU319996	Antrodia malicola	621	582/611	95
			EU427048	Phellinus igniarius	621	565/599	94
			FM872462	Antrodia juniperina	621	553/624	89
			AJ415551	Fomitopsis rosea	621	549/624	88
			AJ542523	Polypore sp.	621	521/605	86

Résumé: Actuellement les champignons des régions tropicales sont sous-représentés dans la classification contrairement à ceux des zones européennes où la diversité et la taxonomie fongique est bien mieux connue. Cette étude est essentiellement destinée à préciser et fiabiliser l'identification moléculaire des champignons tropicaux, notamment ceux qui dégradent les bois. Elle a été réalisée à partir de 80 carpophores secs et 27 mycéliums purs des souches de champignons lignivores de Guyane. Cette étude taxonomique basée sur les séquences de la région ITS entre l'ITS1 et l'ITS2 a montré que parmi les 107 champignons étudiés, 42 ont pu être identifiées par BLAST. La plupart sont des ascomycètes des genres tels que *Alternaria*, *Aspergillus*, *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Helicomyces* et *Xylaria*. BLAST a également identifié les principaux genres de basidiomycètes dégradant les bois tels que *Auricularia*, *Coriolopsis*, *Fomitopsis*, *Geastrum*, *Gloeophyllum*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Phlebia*, *Pycnoporus*, *Stereum*, *Steccherinum* et *Trametes*. Ainsi, cette étude devra permettre une meilleure connaissance de la diversité des champignons lignivores issus d'écosystèmes forestiers de Guyane. Elle servira également de base pour des études concernant la détection précoce de champignons dans les bois et la traçabilité des bois tropicaux.

Mots clés : Champignons lignivores, carpophores secs, séquences des ITS, taxonomie moléculaire, BLASTn, amorces ITS1 et ITS4.

Abstract: The fungi in the tropical regions are actually under-represented in the classification in contrast to those in the European regions where the diversity and fungal taxonomy are better known. This study is primarily to clarify and reliable molecular identification of tropical fungi, especially those that degrade wood. It was conducted from 80 dry fruiting bodies and 27 pure strains of wood-destroying fungi from Guyana. This taxonomic study based on the sequences of the ITS region between ITS1 and ITS2 showed that among the 107 fungi studied, 42 were identified by BLAST. Most of them are in genus of Ascomycetes such as *Alternaria*, *Aspergillus*, *Dipodascus*, *Galactomyces*, *Helicomyces* and *Xylaria*. BLAST has also identified the main types of wood-degrading basidiomycetes such as *Auricularia*, *Coriolopsis*, *Fomitopsis*, *Geastrum*, *Gloeophyllum*, *Ganoderma*, *Lentinus*, *Pycnoporus*, *Stereum*, *Trametes* and *Steccherinum*. Thus, this study should allow a better understanding of the diversity of wood destroying fungi from forest ecosystems of Guyana. It will also serve as a basis for studies on early detection of fungi in wood and timber tracking.

Keys-words: wood-destroying fungi, dry fruiting bodies, sequences of ITS, molecular taxonomy, BLASTn, primer ITS1 and ITS4.